VERGLEICH VERSCHIEDENER FORMEN IMMUNSUPPRESSIVER THERAPIE NACH ALLOGENER, HETEROTOPER HERZTRANSPLANTATION AN DER RATTE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
WOLFGANG HEDDING
aus Büttgen

Bonn 1976

VERGLEICH VERSCHIEDENER FORMEN IMMUNSUPPRESSIVER THERAPIE NACH ALLOGENER, HETEROTOPER HERZTRANSPLANTATION AN DER RATTE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
WOLFGANG HEDDING
aus Büttgen

Bonn 1976

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. M. Siedek

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. H. Vetter

Aus der Chirurgischen Universitäts Klinik Bonn
Kommiss. Direktor: Prof. Dr.Dr. A. Gütgemann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Richard Schwarzbold, 5305 Witterschlick b. Bonn

Inhalt

	Seite
Einleitung	5
Hauptteil	6
I. Theoretische Grundlagen	6
1. Glucocorticoide	7
1.1 Wirkung auf das Immunsystem	7
1.2 antiphlogistische Wirkung	9
1.3 Nebenwirkungen	9
2. Azathioprin	11
2.1 Wirkungsweise	11
2.2 Nebenwirkungen	13
3. Antilymphozytenglobulin	15
3.1 Wirkungsweise	15
3.2 Nebenwirkungen	17
II. Material und Methoden	19
1. Tiere	19
2. Operationstechnik	21
3. Kontrollen	23
3.1 Tastbefund	23
3.2 Elektrokardiogramm	24
3.3 Heart-Rejection-Index	29
3.4 Blutbild	30
3.5 pathologische Anatomie	30
4. statistische Methoden	31
5. Einteilung der Gruppen:	32
A Kontrollen	32

Seite

B Glucocorticoid-Monotherapie 32

C Screening 32

D kombinierte Therapie (Glucocorticoid + Azathioprin) 33

E Nachbehandlung mit ALG 34

III. Ergebnisse 35

1. Therapie von Komplikationen 35
2. Glucocorticoid-Monotherapie 35
3. Screening 39
4. kombinierte Therapie 43
5. Nachbehandlung mit ALG 49

IV. Diskussion 52

V. Zusammenfassung 58

VI. Literaturverzeichnis 59

VII. Lebenslauf

Einleitung

Das größte Problem des biologischen Organersatzes ist heute die Beherrschung der Transplantatabstoßung. Solange eine Antigendifferenz zwischen Spender- und Empfängergewebe besteht, ist man auf die Unterdrückung immunologischer Mechanismen angewiesen, um Einheilung und ausreichende Funktion des Fremdorgans zu erzielen.

Klinisch hat sich in den letzten Jahren, vor allem nach den Erfahrungen mit Nierentransplantationen, die Kombination des Purinantagonisten Azathioprin mit Glucocorticoiden durchgesetzt. (Hume et al.1966). Nach Einführung dieser Therapieform traten Abstoßungskrisen seltener auf und waren leichter zu beherrschen als nach Glucocorticoid-Monotherapie. Inzwischen werden auch Antilymphozytenseren von verschiedenen Arbeitsgruppen mit wechselndem Erfolg angewandt.

Andere immunsuppressive Maßnahmen sind wieder verlassen worden, beziehungsweise werden nur selten gebraucht: Aktinomycin C, Ductus thoracicus-Drainage, extracorporale Blut- und Lymphbestrahlung; neue werden laufend erprobt z.B. aktives und passives enhancement.

Die bei hohen Dosen auftretenden ernsten Nebenwirkungen dieser Therapie verkürzen häufig die Überlebenszeit. Es gilt ein Dosierungsschema für Azathioprin und Prednison zu finden, das, bei Reduzierung der Komplikationen, eine möglichst hohe immunsuppressive Wirkung erreichen läßt.
Wir haben bei unserer Arbeit die kontinuierliche, alternierende und intermittierende Applikation von Glucocorticoiden in Verbindung mit Azathioprin verglichen und an einer kleinen Serie die Wirkung der ALG-Monotherapie untersucht. Das Modell der allogenen, heterotopen Rattenherztranplantation ist wegen seiner guten Reproduzierbarkeit für solche Versuche besonders geeignet.

Hauptteil

I. Theoretische Grundlagen

"Unter immunsuppressiver Therapie kann man alle diejenigen Behandlungsmaßnahmen zusammenfassen, die hemmend in die Antikörpersynthese eingreifen, die Ag-Ak-Reaktion beeinflussen und die immunologische Reaktion vom Spättyp unterdrücken" (Keitel). Eine Verlängerung der Überlebenszeit von Hauttransplantaten nach Gabe von Glucocorticoiden ist seit den Versuchen von Billingham (1951) bekannt. Schwartz und Damashek beobachteten 1958 bei ihren Untersuchungen über die immunologische Wirksamkeit von 6-Mercaptopurin am Kaninchen die Erzeugung einer spezifischen immunologischen Toleranz, deren Dauer und Incidenz von der Antigenmenge, der Dosis und dem Applikationszeitpunkt des Mittels abhängig waren. Zukoski und Calne konnten die Abstoßung von Nierenhomotransplantaten beim Hund mit Hilfe von 6-MP deutlich verzögern.
Die zum Teil bis heute nicht genau geklärten Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung und die unerwünschten Begleiterscheinungen von Glucocorticoiden, Azathioprin, der Depotfrom des 6-MP (Floersheim), und der Antilymphozytenseren sollen im folgenden etwas näher ausgeführt werden.

1. Glucocorticoide

Der Mechanismus, durch den Glucocorticoide die Transplantatüberlebenszeit verlängern, ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen, wobei die antiphlogistische und membranaktive Wirkung im Vordergrund stehen.

1.1 Wirkung auf das Immunsystem

Eine Hyperplasie lymphoider Strukturen bei Patienten mit atrophischen Nebennieren wurde zum ersten Mal von Addison 1885 bei seinen Arbeiten über den Zusammenhang zwischen Nebennierenrindenhormonen und lymphatischem System beobachtet. Obwohl ein lympholytischer Effekt der Glucocorticoide (GK) seit Ingle (1938) bekannt ist, gelang es geraume Zeit nicht-vermutlich wegen zu geringer Dosierung- seine Ergebnisse zu reproduzieren (Mannick 1968). Bereits drei Stunden nach GK-Zufuhr ist eine Lymphocytolyse mit Austritt von Plasma, Pyknose und Karyorhexis nachweisbar (Dougherty 1953). Der lympholytische in-vitro-Nachweis gelang Schreck 1953. Dieser Effekt scheint auf die Erhöhung der Membranpermeabilität von Mitochondrien zurückzugehen, die zur Lysis der Zelle führt (Lundin 1966). Zusätzlich hemmen GK die DNA- und RNA-Synthese der Lymphocyten (Stevens 1965, Brink-Johnson 1965) und den Replikationsvorgang durch Änderung der Stabilität der DNA-Doppelspirale (Dahmus 1965). Die RNA-Synthese wird sofort nach Kontakt mit GK beendet, so daß die Hemmung der RNA-Synthese der erste Effekt auf die lymphoiden Gewebe zu sein scheint (Kidson 1967).

Speciesbedingte Unterschiede der GK-Wirkung sollten beachtet werden: so tritt Lymphopenie beim Menschen wie auch bei Affen und Meerschweinchen, wenn überhaupt, dann nur geringfügig auf, während Mäuse, Ratten und Hunde entgegengesetzt reagieren, was die Übertragbarkeit experimenteller Befunde stark einschränkt. In einer neueren Untersuchung (Stavy 1974) wird allerdings dargestellt, daß die Lymphocytenproliferation in der Induktionsphase zellulärer Immunität in vitro durch Hydro-

cortison an der Ratte angeregt wird. Beeinflußt werden durch GK nicht nur die T-Lymphocyten, sondern auch die humorale Antikörper-synthetisierenden Zellen (Fachet 1970).

Makrophagen spielen in der Praeinduktionsphase der Ak-Bildung eine entscheidende Rolle. GK beeinflussen die Phagozytoseaktivität des RES, indem sie die Aufnahme und Verarbeitung der Fremdstoffe stören (Fagraeus 1958, Kass 1953, Wiener 1967); außerdem stabilisieren sie die lysosomalen Membranen (Weissmann).

Nach Dukor (1969) handelt es sich wahrscheinlich um eine Interferenz der Steroide mit dem Makrophagensystem, dessen Aufgabe in der Umformung partikulärer Antigene in Tolerogene und immunogene Bruchstücke besteht.
Die Intensität der Immunsuppression hängt vom Zeitpunkt der Medikation ab; Eine starke oder vollkommene Unterdrückung der Antikörperbildung wird nur erreicht, wenn GK vor der Antigenzufuhr verabreicht werden, vermutlich weil sie die kleinen Lymphozyten zerstören (Berglund 1953 und Malmkiel 1952).
Je größer der zeitliche Abstand zwischen Antigenreiz und Behandlungsbeginn, desto geringer ist die immunsuppressive Wirkung; am 4. Tag nach Antigengabe haben GK keinen Einfluß mehr auf die AK-Bildung (Diamantstein). Dabei wird die Ig-G-Produktion viel leichter unterdrückt als die von Ig-M.
Nach Overmann (1953) und Torrigiani (1965) läßt sich die Stimulation der Ig-M-Antikörperbildung durch bestimmte Antigene wie z.B. Rinderserum kaum mit Glucocorticoiden supprimieren. Große Antigenmengen setzen die immunsuppressive Wirksamkeit der GK beträchtlich herab oder heben sie sogar auf (Berglund 1956, Dukor 1968, Newsome 1958).
Einen weiteren Angriffspunkt stellen die Komplementabhängigen immunologischen Reaktionen dar (Gewurz 1965).

1.2 antiphlogistische Wirkung

Da beim Abstoßungsvorgang eines Transplantates spezifisch ausgelöste, aber unspezifisch ablaufende Entzündungsreaktionen wesentlich beteiligt sind (Dumonde 1969, Pendergast 1964) kann ein rein antiinflammatorischer Effekt durchaus immunsuppressiv wirken (Pichlmayr 1971). Er besteht in einer Herabsetzung der Gefäßpermeabilität und Hemmung der exsudativen und reparativen Entzündungsreaktionen wie der Leukozytenemigration und der Fibroblastendifferenzierung; zusätzlich in einer Stabilisierung der Zell- und Lysosomenmembranen, sowie einer Förderung der Kollagenolyse und Thrombolyse. Nach Dougherty (1958) überdauert diese Wirkung der GK ihre Metabolisierung = Inaktivierung.

1.3 Nebenwirkungen

Das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen bei GK-Therapie ist seitens des Medikaments von Art, Dosis, Dauer und Applikationsweise, seitens des Patienten von Grundkrankheit, Alter und Geschlecht abhängig. Unter immunsuppressiver GK-Therapie ist der Patient am meisten durch Magen- bzw. Duodenalulcera, daraus folgenden Komplikationen wie Perforation und gastrointestinale Blutung und durch eine herabgesetzte Infektabwehr gefährdet, worauf bakterielle Sepsis, schwere Pilzinfektionen (Soor) und Viruserkrankungen (z.B. Herpes zoster) zurückzuführen sind. Nach Überschreiten einer bestimmten Schwellendosis, deren Höhe je nach Art des Corticoids variiert, kommt es zum sogenannten Steroid-Cushing mit Vollmondgesicht, Stammfettsucht, Büffelnacken, Hirsutismus, Hypertonie, Striae, Osteopathie (Krokowski), Muskelschwäche, Neigung zum Steroid-Diabetes, Wachstumshemmung und Störung der Geschlechtsfunktion. Organverfettungen (Brunner), Haut- (Akne und Purpura) und Augenveränderungen (Glaukom, Katarakt), Elektrolytstoffwechselstörungen, sowie Psychosen (manische und depressive Zustände) sollen nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.
Mit einer Hemmung des Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrindensystems ist nach über 4-5 monatiger Behand-

lung mit einer Dosis oberhalb von 15 mg/die Prednisolon in ungefähr 40% der Fälle zu rechnen (Bethge). Die Restitution kann Wochen und Monate in Anspruch nehmen. Unter Stress (z.B. Operation) ist der Patient nicht in der Lage, genügend Cortisol auszuschütten; Todesfälle wurden nicht selten beobachtet (Bayliss und Fraser). Besonders plötzlicher GK-Entzug muß unbedingt vermieden und deshalb jede Behandlung ausschleichend beendet werden.

Einige dieser Nebenwirkungen können durch entsprechendes Timing der Medikation entscheidend abgeschwächt oder sogar aufgehoben werden, worauf ich in der Diskussion näher eingehen werden.

2. Azathioprin

2.1 Wirkungsweise

Der Purinantagonist Azathioprin gehört zur Gruppe der Antimetaboliten, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Nucleinsäurebausteinen aufweisen. Es handelt sich chemisch um ein heterozyklisches Mercaptopurinderivat, bei dem der Wasserstoff der SH-Gruppe durch einen substituierten Imidazolring ersetzt wurde. Die Wirkung des Präparates beginnt nach 2-4 Tagen, erreicht nach 10 Tagen ihren Höhepunkt und hält nach dem Absetzten mindestens 3-4 Tage an (Keitel 1971).
In der Leber erfolgt unter Abspaltung des Imidazolrings der Umbau zu 6-Mercaptopurin, das früher ebenfalls zur Immunsuppression verwandt wurde. SH-Donatoren wie Glutathion beschleunigen den Abbau, andererseits verlängert der Imidazolylrest durch Erschwerung der Oxidation des S-Atoms die Weiterverarbeitung (Floersheim 1968).
Nach Eindringen in die Zelle wird es in seine eigentliche wirksame Form, das Ribonukleotid Thioinosinsäure, überführt. Diese konkurriert mit Inosinsäure um die Enzyme, die deren Umwandlung in Xanthosinphosphat oder Adenylosuccinat auf dem Wege zur Guanin- bzw. Adeninsynthese induzieren. (Berenbaum 1970); so kommt es zur Bildung fehlerhafter Polypeptidketten. Außerdem führt die Ähnlichkeit zwischen den echten Nukleotiden (Adenin, Guanin) und den "falschen" Basen über einen feed-back-Mechanismus zu einer Verlangsamung der Guanin- bzw. Adeninsynthese (McCollister 1962, Cashey 1964).
Weil das 6-Mercaptopurin in die DNA-Doppelspirale an Stelle der natürlichen Metaboliten eingebaut wird, werden anormale Proteine gebildet, so daß die Zelle zwar überlebt, ihre Replikationsfähigkeit aber verliert (Pelletier 1970).
Azathioprin hemmt den nach Kontakt des Antigens mit dem lymphatischen System einsetzenden Proliferationsvorgang, somit auch die Antikörpersynthese und die Bildung von Effektorlymphozyten. Das Wirkungsoptimum liegt deshalb einige Tage nach der Antigengabe; zur gleichen Zeit ablaufende Immunvorgänge sind selektiv betroffen, ruhende Lymphozyten oder be-

endete Immunvorgänge werden nicht berührt. Diese Selektivität wird durch das gleichzeitige Ablaufen vieler immunologischer Prozesse und die Notwendigkeit zur Langzeittherapie stark beeinträchtigt (Pichlmayr 1971). Allerdings betrifft die Proliferationshemmung alle Gewebe mit hoher Mitoserate, was sich in Form verschiedener Nebenwirkungen niederschlägt.
Beim Kaninchen wird durch 6-MP die zelluläre Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ gehemmt (delayed hypersesitivity) (Borel und Schwartz 1964), auch die humorale Antikörperbildung wird unterdrückt. An F_1-Hybriden von Mäusen zeigten Barnes et al. (1966) eine dosisabhängige Abschwächung der graft-versus-host-Reaktion durch 6-MP.

Aus diesen Gründen wurde Azathioprin bei verschiedenen Organen und Species mit wechselndem Erfolg zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion angewandt.
Eine Verlängerung der Überlebenszeit homologer Hauttransplantate beim Kaninchen konnten Schwartz und Dameshek 1960 nachweisen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen André et al. 1962, die dies einer deutlich verringerten Zahl von Haemozytoblasten zuschrieben. Vorbehandlung und eine verspätet einsetzende Therapie hatten keinen Einfluß auf die Transplantatüberlebenszeit, da 6-Mercaptopurin in die induktive Phase der Antikörperbildung eingreift.
Nierenhomotransplantate am Hund wurden gegenüber unbehandelten Kontrollen erheblich länger toleriert, wobei morphologisch eine geringere Rundzellinfiltration und eine Verödung von Lymphknoten zu beobachten waren (Zukoski 1961).
Mannick et al. legten 1962 folgende Ergebnisse vor:
Wurde eine Nierentransplantation 7 Tage nach der iv-Gabe von Spenderlymphozyten durchgeführt, kam es zu einer second-set Antwort, und die Niere wurde in 3-9 (durchschnittlich 5) Tagen abgestoßen. Verabreichte man zusätzlich 6-MP, überlebte die Niere 10-34 (im Durchschnitt 17) Tage, und die Raktion war vom first-set Typ. Daraus schloß man, daß 6-MP die Induktion der Transplantationsimmunität durch die Lymphozyten verhindere.

Im Gegensatz zu Tinbergen berichtete Shehadeh 1970, daß Azathioprin trotz verschieden hoher Dosierung keine positive Wirkung auf die Funktion von Nierentransplantaten an Ratten hatte.

Bei Lungentransplantationen gelang es, die Rejektion entscheidend hinauszuzögern (Bücherl 1966).

2.2 Nebenwirkungen

Der erwähnte Eingriff in die Proliferationsphase des Zellcyclus scheint zwar die Lymphozyten am empfindlichsten zu treffen, aber gleichzeitig werden natürlich auch andere Zellen mit hoher Mitoserate wie die des Knochenmarkes oder der Schleimhäute geschädigt (Brendel); die Folgen sind Anämie, Leukopenie, Thrombopenie und gastrointestinale Störungen.
Mehrfach wurde über die Hepatotoxizität des 6-MP bzw. Azathioprin mit intrahepatischer Cholostase und herdförmigen Nekrosen berichtet (Einhorn 1964). Nach neueren Untersuchungen hat sie jedoch nicht die vermutete Bedeutung; denn seit der Nachweis des Australia-Antigens möglich ist, müssen viele der früher dem Azathioprin angelasteten Leberschäden auf atypisch verlaufende Hepatitisformen zurückgeführt werden (Pichlmayr 1971).
Über Hemmung der Phagozytose, der Antikörper- und Interferonbildung bringt die allgemein herabgesetzte immunologische Reaktivität eine erhöhte Infektanfälligkeit mit sich (Floersheim 1968). Weitaus seltener treten bei immunsuppressiver Behandlung Tumoren auf, deren Entstehung möglicherweise auf drei Faktoren zurückgeht (Klein):

1. carcinogene Wirkung des Pharmakons selbst
2. versagender immunologischer Kontrollmechanismus gegenüber entartenden oder bereits entarteten Zellen
3. Unvermögen des resistenzgeschwächten Organismus, eine Infektion mit tumorinduzierenden Viren zu beherrschen

Nach Schmähl und Osswald entstand kein maligner Tumor bei Behandlung von Ratten mit 6-MP, lediglich drei gutartige Neu-

bildungen (Thymome) wurden beobachtet. Die Wirkung von Azathioprin auf die Tumorentstehung scheint vom Applikationszeitpunkt in Relation zum carcinogenen Stimulus abhängig zu sein (Dargent 1972).
Chromosomenuntersuchungen nach Therapie mit Azathioprin zeigen, daß toxische Schäden, wie z.B. Chromosomenbrüche auftreten, die denen von urämischen Patienten ähneln (Ganner 1973).

3. Antilymphozytenglobulin

Antilymphozytenglobulin (ALG) ist die nach Immunisierung aus einem Antilymphozytenserum extrahierte -Globulinfraktion, die gegen Lymphozyten einer anderen Species gerichtet ist.

Bereits 1898 beobachtete Metchnikoff, daß ein gegen die Lymphozyten des Kaninchens gerichtetes Serum vom Meerschweinchen die polymorphkernigen Leukozyten des Spenders agglutinierte (nach Najarian 1971). Von Bedeutung waren die Versuche von Woodruff, der als erster Antilymphozytenseren zur Verlängerung der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate einsetzte (Woodruff 1960 + 1964). Im Tierexperiment erprobten in der Folgezeit verschiedene Arbeitsgruppen die Wirksamkeit des ALG bei der Verpflanzung anderer Organe (Monaco 1966, Pichlmayr 1966, Gray 1964). Starzl führte es 1967 - zusätzlich zur herkömmlichen Therapie mit Imuran und Corticoiden - bei der Behandlung von nierentransplantierten Patienten in die Klinik ein.
In den letzten Jahren bemühte man sich vor allem, ein hochgereinigtes ALG in standardisierten Chargen herzustellen, um die Nebenwirkungen zu reduzieren (Traeger 1969) und eine noch bessere Immunsuppression zu erzielen, wobei die Wahl des Antigens eine wichtige Rolle spielt.
Inzwischen wurde das Anwendungsgebiet des ALG durch die erfolgreiche Behandlung von Autoimmunopathien (Multiple Sklerose, Kollagenosen u.a.) erweitert (Brendel 1973).

3.1 Wirkungsweise

In vitro zerstört ein hochtitriges ALG 80% aller zugegebenen Lymphocyten (Brendel 1970).
In vivo kommt es bei Behandlung mit ALG zu einer mehr oder weniger starken Lymphopenie (Pichlmayr 1968), deren Ausmaß nicht mit der immunsuppressiven Wirksamkeit des Serums korreliert. Seifert und Brendel beobachteten bei ihren Versuchen über den Einfluß von ALG auf ^{51}Cr-markierte Lymphocyten, daß die ge-

schädigten Zellen in der Lunge aufgefangen und in der Leber abgebaut werden, während die Anzahl der Lymphocyten im peripheren Blut absank. Betroffen sind alle im Augenblick der Injektion zirkulierenden, aber auch die in das transplantierte Organ eingedrungenen Lymphocyten (Brendel 1970); wobei die Lymphopenie im Blut nur flüchtig ist, in der Ductus thoracicus-Lymphe aber mehrere Tage bestehen bleibt. (Girardet 1974).

Nach ALG-Behandlung kommt es zur Verkleinerung der Lymphknoten mit follikulärer Aplasie, Verarmung an Lymphocyten vor allem in den paracorticalen Feldern und einer Sinushistiocytose als Ausdruck einer RHS-Reizung (Kaden 1971). Dieser Verlust scheint besonders die die zellulär gebundene Immunität vermittelnden Lymphocyten zu treffen (Lance 1970).

Ungefähr ab dem 3.Tag tauchen bei fortgesetzter Therapie hauptsächlich in der Ductus thoracicus-Lymphe ungewöhnliche Zellformen auf, die Ähnlichkeit mit Plasmazellen aufweisen. Vermutlich handelt es sich um transformierte Lymphocyten, die durch die chronische Einwirkung des ALG entstehen (Land 1969). Wichtige Befunde bezüglich der Wirksamkeit des ALG sind die Verhinderung einer second set-Reaktion (Gruppe Medawar, z.B. Levey 1967) und einer experimentellen allergischen Encephalomyelitis (Land 1968), was die starke Beeinträchtigung der zellulären Immunreaktion verdeutlicht. Dagegen wird die humorale Antikörperbildung wenig beeinflußt (Najarian 1971). Auffallend war in den experimentellen und klinischen Befunden, daß die Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger -im Gegensatz zu anderen Therapieformen- beim ALG eine relativ geringe Rolle spielt (z.B. Alexandre 1969, Simmons 1970). Außerdem scheint es durch die Besetzung von Lymphocytenrezeptoren deren Fähigkeit Fremdantigen zu erkennen, auszuschalten ("blind folding"). Diese Hypothese Medawars (Levey 1966) wird bestätigt durch die Arbeiten von Paraskevas et al. 1972, die das blind folding auf das Vorliegen eines bestimmten Verhältnisses von 7S- zur 19S Fraktion des ALG zurückführten. Möglicherweise kommt es aber auch nach längerer Therapie zu einer überstürzten Bildung von immunologisch inkompetenten

Zellen; dabei scheint das ALG als Antigen und nicht als Antikörper zu fungieren ("sterile activation") (Levey 1966).

Interessant ist ebenfalls -u.a. wegen der Rolle des Komplements bei Immunvorgängen- die komplementinaktivierende und entzündungshemmende Wirkung des ALG; die letztere korreliert mit dem Lymphotoxizitätstiter sogar besser als die immunsuppressive Potenz des Serums (Perper 1970).

Neue Möglichkeiten bieten sich in der Therapie durch das Auftreten einer spezifischen immunologischen Toleranz und die Induktion von aktivem oder passivem Enhancement bei ALG-Applikation.

3.2 Nebenwirkungen

Da es nahezu ausgeschlossen ist, aus Körperflüssigkeiten reine Lymphocyten zur Herstellung von ALS zu gewinnen, sind diese Seren nicht allein gegen Lymphozyten gerichtet. Vielmehr kommt es unter Umständen nach Injektion zu Fieberreaktionen durch massive Granulozytenzerstörung oder zu Anämie, Thrombozytopenie und lokalen Schmerzen an der Injektionsstelle (wahrscheinlich durch Ag-Ak-Reaktion mit dem umliegenden Gewebe (Pichlmayr 1968). Diese Vorgänge sind entweder auf verschiedene Antikörpergruppen oder auf Kreuzreaktionen der gegen Lymphozyten gerichteten Ak zurückzuführen (Thierfelder 1968). Deshalb versucht man, durch mehrfache Absorption ein Großteil der unerwünschten Ak zu erfassen. In den letzten Jahren setzt sich immer mehr die Verwendung von kulturell gezüchteten Lymphoblasten als Antigen durch; bei diesen Seren scheinen obige Komplikationen nicht aufzutreten (Najarian 1971).

Hyperergische Reaktionen: Urticaria, Anaphylaxie, Serumkrankheit etc. können unter der Therapie mit ALG auftreten. Ob die gegen das therapeutisch eingesetzte Serum produzierten Ak dessen Wirksamkeit beeinträchtigen, scheint nicht restlos geklärt zu sein. Während Raju (1969) über eine ungestörte Immunsuppression berichtet, steht sie nach Simmons (1970) in umgekehrt proportionalem Verhältnis zum anti-ALG-AK-Titer des Em-

pfängers. Auch Brendel beschreibt 1973 eine nachlassende Wirkung. Mehrfach wurde im Experiment fluoreszenzmikroskopisch eine Ablagerung von Fremdserum, Komplement und γ-Globulin an der Basalmembran der Glomerulumschlingen festgestellt (Reis 1971), eine echte Serumnephritis trat beim Menschen bis heute nur vereinzelt auf. Andererseits werden hyperergische Reaktionen durch gleichzeitige Gabe anderer Immunsuppressiva abgeschwächt. Wie bei jeder Form der Immunsuppression besteht auch hier die Gefahr einer fulminant verlaufenden Infektion, vornehmlich einer Pilzinfektion. Die Incidenz und Häufigkeit scheint etwas geringer zu sein als bei anderen Immunsuppressiva (Fateh - Moghadam 1967).

Über die Entstehung eines Retikulumzellsarkoms an der Injektionsstelle des ALG berichtete Deodhar, doch ist wohl auch hier kein größeres Risiko als bei den übrigen Therapieformen zu erwarten.

II. Material und Methoden

1. Tiere

Transplantatempfänger waren Albino-Lewis Ratten (L) aus dem Wistar-Institut, wo sie seit 1910 gezüchtet werden. (Palm 1971.) Als Spender dienten die F1-Hybriden (LBNF1) des Lewis und Brown-Norway-Stammes (BN), der sich von wilden Ratten herleitet (Robinson 1965). Homozygotie beider Stämme ist durch 2oo tägige Überlebenszeit von Hauttransplantaten und Histocompatibilitätstestung gesichert. Wir nahmen ausschließlich männliche Tiere, und schlossen so eine Beeinflussung der Rejection durch eventuell vorhandene geschlechtsgebundene Transplantationsantigene aus. Von Vorteil war außerdem, daß Medikamente lange Zeit über die V.dorsalis penis injiziert werden konnten.

Alle Tiere waren zwischen 250 und 350 g schwer und wurden von Microbiological Associates Inc. Walkersville Maryland bezogen. Bei der Ratte sind wenigstens 4 Genorte bekannt, die die zellulären Antigene determinieren (Ag-A, Ag-B, Ag-C, Ag-D). Am wichtigsten für die Transplantationsimmunität ist der Ag-B-Locus (Bogden 1960); für ihn sind 6 Allele gefunden worden. (Bezeichnung nach Stamm-Kennbuchstaben): LEW (Ag-B1), WF (Ag-B2), BN (Ag-B3), DA (Ag-B4), AUG-28807 (Ag-B5), BUF (Ag-B6).

Tabelle 1 Antigen-Phänotypen der verwendeten Stämme (Palm 1971) antigen-phenotype

strain	coat-color	Ag-A	Ag-B	Ag-C	Ag-D8
LEW	albino	A	B1	C1	X-D1
BN	chocolate	A	B3	C1,C2	not D1

F1-Hybriden besitzen die Antigene beider Elternteile und Transplantatempfänger reagieren nur auf ihnen fehlende Antigene (Snell). Nach Guttmann (1974) ist die Antigendifferenz zwischen

Ag-B1 und Ag-B3 mittelstark, was besonders für die Beurteilung fein abgestufter Dosierungsschemata günstig ist. Die Tiere waren unter gleichen Bedingungen bei 22°C und 50% Luftfeuchtigkeit im Tierstall des Pathologischen Instituts der Universität Bonn untergebracht. Sie wurden in Makralon-Käfigen gehalten und mit Höveler Trockenfutter für Zuchttiere beziehungsweise Wasser ad libitum ernährt.

Nach Ratte ist die Transplantatüberlebenszeit auch von der Tageszeit abhängig, zu der die Operation vorgenommen wurde. Dies hängt vermutlich mit dem diurnalen Rhythmus der Kortikosteronsekretion zusammen, deren Maximum bei Ratten, wie bei allen Nagern, anders als beim Menschen am Abend liegt. Deshalb verwendeten wir nur Tiere, die bereits zwei Wochen unter den beschriebenen Bedingungen gelebt hatten, um ihnen Zeit für die Neuanpassung der Korticosteronsekretion zu lassen, und operierten stets zur gleichen Tageszeit, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

2. Operationstechnik

Die Transplantation wurde in der Technik von Sun Lee (1973), modifiziert nach Siedek durchgeführt; sie erfolgte in Äther-Narkose. Zu diesem Zweck wurde der Boden eines luftdicht verschließbaren Glaszylinders mit Mull ausgelegt und mit Aether pro narcosi beträufelt. Das Tier wurde in den Behälter gesetzt und erst nach Erreichen des Toleranzstadiums wieder herausgeholt (keine Schnauzhaarbewegung, ruhige Atmung, Relaxation). Ein mit Mull und Äther gefülltes Plastikröhrchen, das über die Schnauze gestülpt und nach Belieben wieder abgenommen wurde, diente zur Steuerung der Narkose. Kam es zum Atemstillstand, wurde die Ratte über eine 5 ml-Pipette Mund zu Nase wiederbelebt.

Arbeitsweise des Transplantates
Strömungsverlauf: Aorta des Empfängers, Aorta des Transplantats, A.coronaria, sinus coronarius, rechter Vorhof, rechte Kammer, A.pulmonalis, V.cava des Empfängers.
Das heterotope Herz erträgt Ischaemie und Rejection besser als das orthotop transplantierte, denn das linke Herz wird nicht durchströmt und hat keine Arbeit zu leisten. Deshalb eignet sich dieses Modell besonders gut dazu, die Wirksamkeit bestimmter Medikamente im Hinblick auf die Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit zu testen.

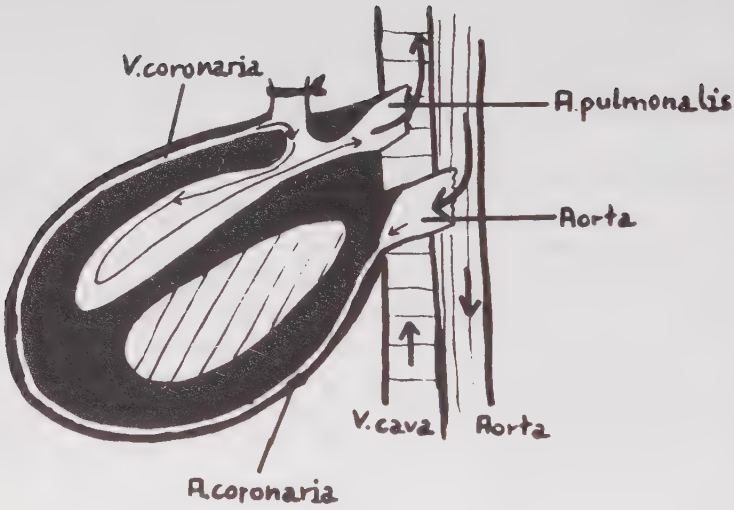

Abb. 1 heterotop tranplantiertes Herz (nach C. Hedding)

3. Kontrollen

Im Gegensatz zu anderen häufig benutzten Modellen ist die Funktion des Fremdorgans bei der heterotopen Herztransplantation einfacher und genauer zu überwachen. Abstoßung des Transplantats bedeutet wegen seiner Funktionslosigkeit nicht gleichzeitig den Tod des Tieres.
Meßgrößen der Abstoßung waren für uns in erster Linie der Tastbefund, das EKG, und der heart-rejection-index, zusätzlich Blutbildveränderungen und die histologische Beurteilung des Transplantats.

3.1 Tastbefunde

Wegen der intraabdominellen Lage des Organs können Veränderungen von Größe, Konsistenz und Kontraktionskraft leicht palpatorisch festgestellt werden.
-Konsistenz
Bei Beginn der Rejection kommt es zu einer leichten Konsistenzvermehrung des Herzens, die im weiteren Verlauf immer stärker wird und der Größenzunahme zeitlich vorangeht.
-Größe
Das Herz nimmt vor allem im Längsdurchmesser proportional zum Grad der Abstoßung zu; eine Thrombose des Ausflußtraktes betrifft mehr den Querdurchmesser, zu Verwechslungen kommt es nicht, weil Thrombosen in der Regel nach den ersten Tagen nicht mehr auftreten. Gleichzeitig steigt das Herzgewicht erheblich an, von durchschnittlich 0.85 g auf 1,7 bis 2,5 g.
-Kontraktionskraft
Zusammen mit Größenzunahme und Konsistenzvermehrung verliert das Herz ständig an Kontraktionskraft, "es schlägt nicht mehr durch".

Gradeinteilung

O normale Größe und Konsistenz
+ Herz gering vergrößert, konsistenzvermehrt, gute Kontraktion
++ Herz deutlich vergrößert, verminderte Kontraktionskraft
+++ Herz enorm vergrößert, hart,mit kaum fühlbarer Kontraktion

3.2 EKG

Das EKG wurde am narcotisierten Tier über subcutan liegende Injectionsnadeln (Größe Nr.1) abgeleitet. Als Gerät stand uns eine Hellige-Dreifachschreiber (Multiscriptor 9400 T), Laufgeschwindigkeit 50 mm/sec zur Verfügung.
Um die Potentiale beider Herzen zu unterscheiden, wandten wir zwei Verfahren an:
1. Ableitung entsprechend den klinischen Extremitätenableitungen. I, II, III. (Abb. 2,3)
2. Ableitung über zwei in Höhe des Transplantats liegende Nadeln und die Elektroden an den unteren Extremitäten AI, AII, AIII. (Abb. 4 und 5)
In der abdominellen Ableitung finden sich in der Regel nur sehr flache Potentiale des orthotopen Organs, was die Unterscheidung von den meist sehr hohen Amplituden des Transplantats erleichtert. Mit Hilfe der Extremitätenableitung, die der des Menschen entspricht, wurde die Frequenz des eigenen Herzens ermittelt, um zusätzlich eine Verwechslung mit den niedervoltigen Potentialen des Transplantats während der Rejection in der abdominellen Ableitung zu vermeiden.
Die praecordiale Ableitung birgt je nach Lage des heterotopen Organs Verwechslungsmöglichkeiten mit der Aktion des eigentlichen Herzens in sich und wurde deshalb nicht verwendet.

Abb. 2 Extremitätenableitung an der Ratte

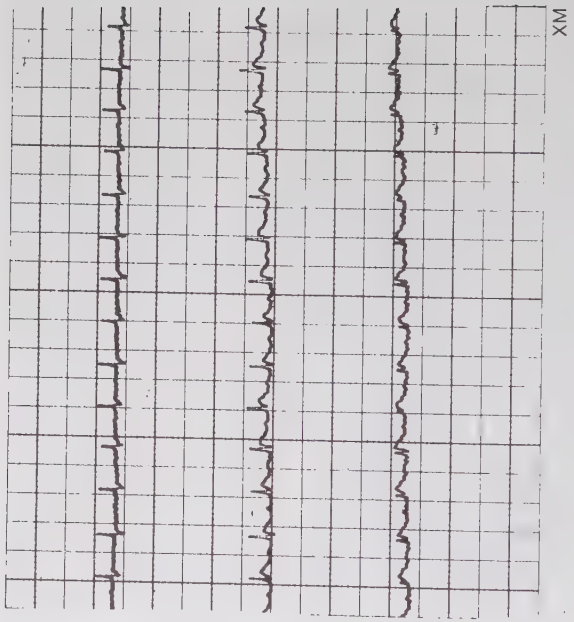

Abb. 3 normales EKG, Extremitätenableitung

Abb. 4 Abdominalableitung. Der Pfeil markiert die Lage des heterotopen Herzens

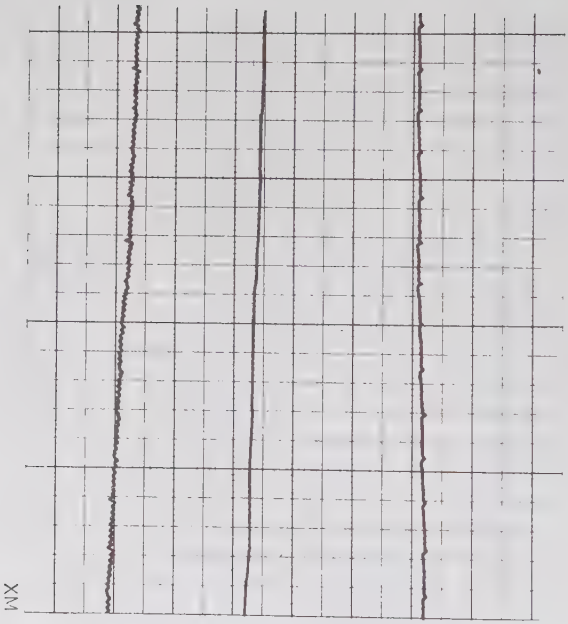

Abb. 5 normales EKG, Abdominalableitung einer nicht tranplantierten Ratte mit isoelektrischer Linie in AII!

3.3 Heart-Rejection-Index

Schon bei Versuchen mit unbehandelten Ratten stellten wir fest, daß die Herzfrequenz allein nicht exact den Grad der Abstoßung angab; ferner setzte die Bradykardie wesentlich später ein als die Veränderung des Palpationsbefundes. Bei Frequenzen unter 300 Schlägen/min konnten keine sicheren Angaben über den Stand der Abstoßung gemacht werden.
Die von Bell 1972 eingeführte FST (functional survival time) beinhaltet den Zeitpunkt, an dem das Transplantat an orthotoper Stelle der physiologischen Kreislaufbelastung wahrscheinlich nicht mehr gewachsen gewesen wäre; dazu bezog er den Tastbefund als neuen Parameter für die Abstoßung mit ein.
Das Auftreten isoelektrischer Aktivität im EKG bezeichnet man im Gegensatz dazu als TST (total survival time).
Gerade bei behandelten Transplantatempfängern fanden wir noch eine geringe elektrische Aktivität im EKG bei gleichzeitig hochgradig veränderten Palpationsbefunden. Aus diesem Grund führten Siedek und C. Hedding in ihren Arbeiten -ähnlich wie Alexandre 1971 bei Nierentransplantationen- einen sogenannten heart-rejection-index ein (HRI), der zu einer genaueren Beurteilung und zu besseren Vergleichsmöglichkeiten vieler Transplante führte.
Für ein normal funktionierendes heterotopes Organ wurde als untere Frequenzgrenze 350 Schläge/min, als obere Grenze des Palpationsbefundes + festgesetzt. Es gilt:

$$HRI = \frac{\text{Tastbefund (T)}}{\text{Frequenz (F)}} \times 350$$

normalerweise also: $HRI = \frac{1}{350} \times 350 = 1$

Liegt der HRI < 1, ist keine Abstoßung nachweisbar.

3.4 Blutbild

Zur Bestimmung des Hb, der Leukozytenzahlen und zur Anfertigung eines Blutausstriches wurde das Blut nach Stich mit einer sterilen Injectionsnadel in die Schwanzwurzel mittels einer Pipette entnommen.
Hb, Ht und Leukozytenzahlen wurden mit dem Coulter Counter (Modell FN) und im Haemoglobinometer (beide von Coulter Electronics LTD) ermittelt.
Die Ausstriche wurden im Hema-Tek slide stainer (Ames Company England) nach Pappenheim gefärbt und die Differentialblutbilder bei 1oo facher Vergrößerung in Ölimmersion mit einem Leitz-Mikroskop ausgewertet.

3.5 Pathologische Anatomie

Bei Auftreten eines isoelektrischen EKG´s wurde jedes Tier getötet, seziert und beide Herzen gewogen. Gleichzeitig prüften wir die Anastomosen auf ihre Durchgängigkeit.
Für die histologische Untersuchung konservierten wir die Organe in 0.8% igem Formalin. Durch die Spitze, Taille und Vorhofebene wurden senkrecht zur Herzachse Schnitte gelegt und die Organpartien in Paraffin (Autotechnikon) eingebettet. Die mit dem Mikrotom 1On angefertigten Schnitte wurden dann mit Haematoxylin-Eosin gefärbt.
Die Präparate wurden bei bis zu 25O-facher Vergrößerung mit einem Leitz-Mikroskop betrachtet und interessante Abschnitte photographiert.

4. Statistische Methoden

Das Ziel der statistischen Untersuchungen war es, jeweils ein bestimmtes Kollektiv einer anderen Gruppe gegenüberzustellen, und die Frage zu beantworten, ob ein Unterschied bestand und ob er zufällig aufgetreten oder auf eine Gesetzmäßigkeit zurückzuführen war.
Bei einem Versuch mit zwei Stichproben kann zum Mittelwertvergleich der Student-t-test angewandt werden. Liegen mehr als 2 Stichproben vor, wird der Vergleich ungenau.
Es bietet sich in dem Fall die Varianzanalyse an, bei der die Gesamtstreuung der Versuchsergebnisse in einzelne Komponenten zerlegt wird.
Zur Feststellung der Signifikanz, also der Wertigkeit von Mitteln im Vergleich zu zufälligen Abweichungen, wird die Nullhypothese zugrunde gelegt. Sie besagt, daß unterschiedliche Ergebnisse von Prüf- und Kontrollkollektiv zufällig sind, setzt also voraus, daß alle Stichproben einer Grundgesamtheit entstammen. Die Varianz zwischen den Stichproben und die innerhalb der Stichproben würden sich dann entsprechen, der Quotient würde 1. Bei einem signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen stiege der Quotient deutlich über 1; ob Signifikanz besteht, kann den F-Wert-Tabellen entnommen werden. Unterschiede im einzelnen müssen durch individuelle Mittelwertvergleiche ermittelt werden. Der Dunnett-Test wurde dazu herangezogen.
Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung nach signifikantem Ausfall des F-Testes bietet die Auswertung der orthogonalen Kontraste. Da die Varianz der Stichproben in Einzelkomponenten zerlegt wird, ist die Zahl der möglichen Kontraste a-1, wobei a die Anzahl der Stichproben bezeichnet. Der Quotient aus linearen Kontrasten und ihren Versuchsfehlern entspricht wieder einer F-Verteilung.

5. Einteilung der Gruppen

A. Kontrollen

Die Übereinstimmung der Histokompatibilität wurde durch isogene Kontrollen (L→L) überprüft. An unbehandelten allogenen Transplantaten beobachteten wir die Abstoßung und untersuchten folgende Parameter: Tastbefund, EKG (bes. Herzfrequenz), Enzyme, cytotoxische Antikörper, Körpergewicht der Tiere, die mittlere Überlebenszeit der transplantierten Organe, sowie Herzgewicht und Histologie am Tag der Abstoßung.
(C. Hedding 1976)

B. Glucocorticoid-Monotherapie

Wir verwandten 6-Methylprednisolon, das als "Urbason solubile" der Farbwerke Hoechst AG im Handel ist. Bei täglicher Kontrolle von EKG und Tastbefund wurde die Überlebenszeit bestimmt, abgestoßene Herzen wurden fixiert und histologisch untersucht.

B_1: direkt postoperativ einmalige Injektion von 30 mg/kg MP i.v. , n= 10

B_2: direkt postoperativ 30 mg/kg MP i.v., dann täglich 3mg/kg i.v. , n= 20

B_3: beginnend am OP-Tag jeden 3.Tag 30 mg/kg MP i.v., n = 20

B_4: beginnend am OP-Tag jeden 5.Tag 30mg/kg MP i.v., n = 20

B_5: beginnend am OP-Tag jeden 7.Tag 30 mg/kg MP i.v., n = 8

B_6: einmalige Injektion von 30 mg/kg MP i.v. am 7.p.op. Tag, n = 8

C. Screening

Um die Unterschiede zwischen kontinuierlicher und intermittierender Corticoid-Therapie hervorzuheben ohne eine weitere Dosiserhöhung vorzunehmen, wurde das Modell mit Azathioprin abgeschwächt. Deshalb mußten wir erst die zur begrenzten Verlängerung der Transplantat-Überlebenszeit erforderliche Dosis Azathioprin ermitteln, um danach zusätzlich kontinuierlich oder intermittierend MP zuführen zu können.

C_1:tägliche Gabe von 4mg/kg Azathioprin, n = 2
C_2:tägliche Gabe von 10mg/kg Azathioprin, n = 2
C_3:tägliche Gabe von 20mg/kg Azathioprin, n = 2
C_4:tägliche Gabe von 30mg/kg Azathioprin, n = 2
C_5:tägliche Gabe von 40mg/kg Azathioprin, n = 2

C_6:tägliche Gabe von 10mg/kg Azathioprin und 3mg/kg MP, n=2
C_7:tägliche Gabe von 20mg/kg Azathioprin und 3mg/kg MP, n=2
C_8:tägliche Gabe von 30mg/kg Azathioprin und 3mg/kg MP, n=2
C_9:tägliche Gabe von 40mg/kg Azathioprin und 3mg/kg MP, n=2

C_{10}:tägliche Gabe von 10mg/kg Azathioprin, zusätzlich jeden 3.Tag 30mg/kg MP, n = 2
C_{11}:tägliche Gabe von 20mg/kg Azathioprin, zusätzlich jeden 3. Tag 30mg/kg MP, n = 2
C_{12}:tägliche Gabe von 30mg/kg Azathioprin, zusätzlich jeden 3. Tag 30mg/kg MP, n = 2
C_{13}:tägliche Gabe von 40mg/kg Azathioprin, zusätzlich jeden 3. Tag 30mg/kg MP, n = 2

D. Kombinierte Therapie (Glucocorticoide + Azathioprin)

Nach den Ergebnissen des Screening schien uns eine tägliche Dosis von 10mg/kg Azathioprin i.p. am besten geeignet, um die Wirkung der einzelnen Corticoid-Dosierungsschemata zu differenzieren.

D_1:tägliche Gabe von 10mg/kg Azathioprin und 3mg/kg MP (kontinuierlich), n = 10
D_2:tägliche Gabe von 10mg/kg Azathioprin, zusätzlich jeden 2.Tag 6mg/kg MP i.v. (alternierend), n = 10
D_3:tägliche Gabe von 10mg/kg Azathioprin, zusätzlich jeden 3.Tag 30mg/kg MP i.v. (intermittierend), n = 10

E. Nachbehandlung mit ALG

4 Tiere erhielten vom OP-Tag bis zum 5. p.op. Tag täglich, danach bis zum 15.p.op.Tag jeden 2. Tag 0,5 ml KARLS (von Microbiol. Ass. Walkersville, Maryland) i.v. Zur Kontrolle behandelten wir gleichzeitig zwei Tiere mit 0,5 ml Kaninchen Ig-G. Bei allen Tieren dieser Gruppe wurden täglich Tastbefund, EKG, Hb, Ht, Leukocyten und das Differentialblutbild bestimmt.

III. Ergebnisse

1. Therapie von Komplikationen

Herz- und Atemstillstände während der Narkose konnten fast immer durch Herzmassage und Mund- zu- Nase- Beatmung über eine Pipette behoben werden.
Intraoperative Blutungen waren selten und kamen in der Regel spontan zum Stillstand. In wenigen Ausnahmen legten wir Tabotamps (Johnson & Johnson, Hamburg) ein, warteten erneut ab und injizierten zur Volumensubstitution 3-5 ml physiologische Kochsalzlösung in die Vena dorsalis penis. Selten traten postoperative Blutungen auf, die trotz Infusion zum Tode des Tieres führten.

Intraoperative Darmverletzungen wurden durch zweireihige Naht versorgt, Komplikationen kamen auch bei immunsuppressiver Therapie nicht vor.

Bei fast allen Tieren beobachteten wir unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit relativ spät auftretende Fadeneiterungen an der Bauchnaht. Einmal komprimierte der ausgedehnte Abszeß die Urethra, was zur kompletten Harnverhaltung führte. Aufgrund falscher Interpretation der Symptomatik führten wir die Revision zu spät durch und waren gezwungen, eine Blasenfistel anzulegen. Das Tier starb kurz darauf an den Folgen einer Peritonitis. Sonst verlief in allen Fällen nach Revision (Entfernung der Fäden, Spülung mit Kochsalzlösung) die Wundheilung ungestört. Antibiotika wurden in keiner Form angewandt.
Bei der Section eines mit 40 mg/kg Azathioprin in Kombination mit 3mg/kg MP/die behandelten Tieres sahen wir in der 12. postoperativen Woche einen großen entzündlichen Tumor im Unterbauch mit septischen Metastasen in Leber und Lunge.

2. Glucocorticoid-Monotherapie (Gruppe B)

Die Transplantatüberlebenszeiten in den einzelnen Gruppen sowie ihre Mittelwerte und Streuungen sind der nachfolgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

Bei der Auswertung dieser Ergebnisse in der Varianzanalyse zeigte sich, daß die Werte nicht aus einem Kollektiv stammten (p 0,01) und deshalb mit der Kontrollgruppe verglichen werden dürfen. (Tabelle 3)
Der Dunnett-Test (Tabelle 4) erbrachte bei der geringen Verlängerung der Transplantat-Überlebenszeit gegenüber den Kontrollen eine Signifikanz für Gruppe B_3 mit p 0,01 und für Gruppe B_6 mit p 0,05.
Die Gruppe B_5 erreicht nicht ganz die Signifikanz bei 5 % Wahrscheinlichkeit. Möglicherweise ist die Zahl der Werte nicht groß genug.

	Kontrolle		B_1		B_2		B_3		B_4		B_5		B_6	
	f	x	f	x	f	x	f	x	f	x	f	x	f	x
	2	8	1	12	2	9	3	10	2	9	1	12	1	13
	4	9	2	13	2	10	3	11	1	10	1	13	1	13
	6	10	1	15	2	11	1	12	1	11	1	15	2	14
	8	11			5	12	1	13	4	12	1	16	1	15
	8	12			1	13	3	14	3	13			1	17
	8	13			1	14	2	15	1	15				
	4	14			1	15	1	16	1	16				
							1	17	1	17				
							1	18						
X		11,4		13,25		11,57		13,81		12,43		14		14,17
S		1,68		1,62		1,74		4,4		2,38		1,83		1,72
n	40		4		14		16		14		4		6	

Tabelle 2: Meßwerte, Mittelwerte und Streuung der Transplantatüberlebenszeit bei unbehandelten Kontrollen und mit Glucocorticoid-Monotherapie behandelten allogenen Herztransplantaten.

Tabelle 3 Gruppe B: Einfache Varianzanalyse

Var. Urs.	SQ	FG	MQ	$\hat{F}$	$F_{tabul.}$
zwischen	112,72	6	18,79	3,15	3,01 (p = 0,01)
innerhalb	542,48	91	5,96		
total	655,20	97			

Tabelle 4 Gruppe B: Dunnett's Test

Vergleich	Testgröße V	Dunnett's $t_{corr.}$	Testergebnis
(A)-(B1)	V_1= 1,445	v=6 f=91	Ø
(A)-(B2)	V_2= 0,224	$t_{corr.}$= 2,33 (für p=0,05	Ø
(A)-(B3)	V_3= 3,340		XX
(A)-(B4)	V_4= 1,357		Ø
(A)-(B5)	V_5= 2,031	$t_{corr.}$= 2,97 (für p=0,01)	Ø
(A)-(B6)	V_6= 2,588		X

Ø : p 0,05

X : p 0,05

XX : p 0,01

3. Screening (Gruppe C)

Gruppe C_{1-5}:

Die Ergebnisse verschiedener Dosierungen der Azathioprin-Monotherapie zeigen, daß erst ab 20 mg/kg Azathioprin/die mit einer deutlichen Verlängerung der Transplantat-Überlebenszeit zu rechnen ist (17Tage). Bei 30mg/kg betrug sie 25 bzw. 27 Tage, bei 40 mg/kg ist sie unbegrenzt.

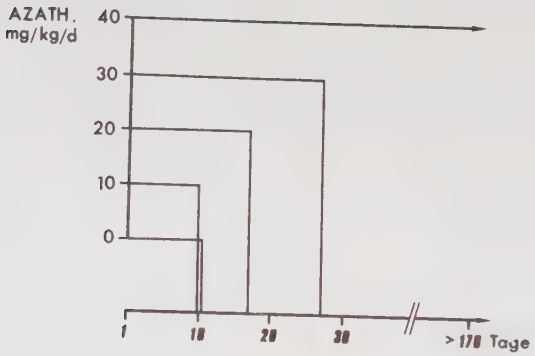

Abb. 6 Gruppe C_{1-5}: Tranplantatüberlebenszeit nach Behandlung mit verschiedenen Azathioprin-Dosen

Gruppe C_{6-9}:

Die Kombination einer aufsteigenden Dosierung von Azathioprin mit einer kontinuierlichen Glucocorticoid-Therapie (3mg/kg/die) ergaben bei 10 mg/kg Azathioprin/die keine deutliche, ab 20mg/kg Azathioprin/die bereits eine unbegrenzte Transplantat-Überlebenszeit (108 Tage).

Gruppe C_{10-13}:

Demgegenüber erreichten wir mit intermittierender Glucocorticoid-Therapie (30mg/kg MP jeden 3. Tag) schon bei 10mg/kg Azathioprin/die eine unbegrenzte Überlebenszeit (131 Tage).

Diese Ergebnisse ließen uns vermuten, daß bei der Dosis von 10 mg/kg Azathioprin/die die unterschiedlichen Formen der Glucocorticoid-Applikation am besten zu vergleichen wären. Bei den Tieren mit 40 mg/kg Azathioprin/die versuchten wir sowohl bei kontinuierlicher wie auch bei intermittierender MP-Gabe nach unbegrenzter Transplantat-Überlebenszeit (100 Tage p.op.) durch Absetzen des Azathioprins am 120. Tag eine Differenzierung zwischen beiden Anwendungsformen zu erreichen. Kein Tier zeigte jedoch bis zum 200. Tag eine Veränderung der Abstoßungssymptomatik, so daß vielleicht nach einer längeren Zeit stärkster Immunsuppression eine Dosisverminderung oder sogar das Absetzen der Medikation bei Ratten möglich erscheint. (Abb. 7)

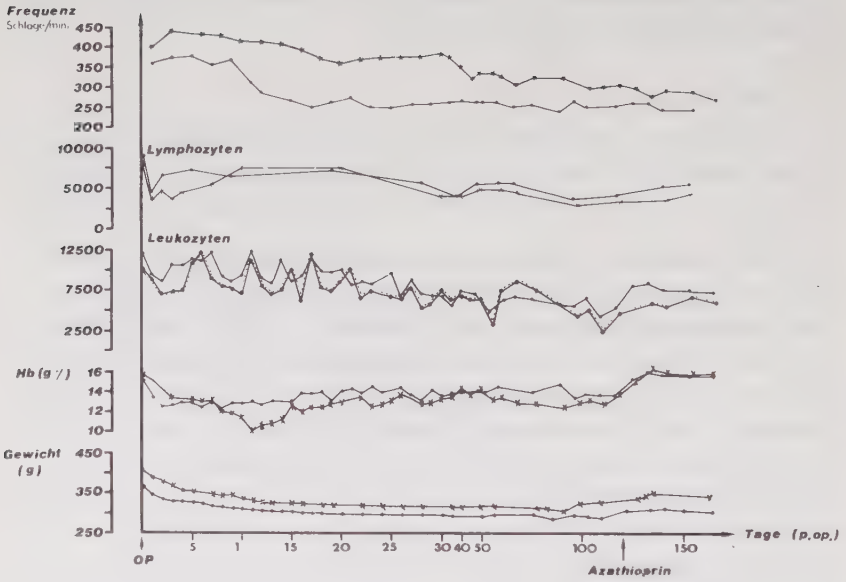

Abb. 7: o--o Gruppe C_9: 40mg/kg/die A. + 3 mg/kg/die MP
+--+ Gruppe C_{13}: 40mg/kg/die A. + 30 mg/kg/ MP jeden 3. Tag

Die Abstoßungskrisen, gekennzeichnet durch Leukocytenanstieg scheinen phasisch (im Vielfachen von 7 Tagen) bis etwa zum 50. Tag aufzutreten. Die Leukocyten-Depression, Anämie und abnahme des Körpergewichts sind nach Absetzen des Azathioprins rückläufig.

4. Kombinierte Therapie (Gruppe D)

Nach den Ergebnissen des Screening stellten wir drei Gruppen zusammen mit verschiedenem Glucocorticoid-Dosierungsschema bei gleichbleibender Therapie mit 10 mg/kg Azathioprin/die i.p. .
Als Bewertungsgrundlage für die immunsuppressive Wirkung nahmen wir wie in II.3.3. ausgeführt den Rejektionsindex (HRI); das war wegen der kleiner werdenden Gruppen allerdings nur bis zum 18. p.op. Tag möglich. Die Mittelwerte und Standardabweichungen des HRI für jeden Tag sind in Tabelle 5 zusammengestellt und in Abbildung 8 veranschaulicht.

Bis zum 50. Beobachtungstag hatten bei kontinuierlicher Therapie drei Tiere (am 17.,19.,42. Tag p.op.), bei alternierender Therapie sechs Tiere (am 11., 16., 17.,36.,46., 48. Tag p.op.) und bei intermittierender Therapie zwei Tiere (am 18., 35. Tag p.op.) das Transplantat abgestoßen.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse umfaßte eine Varianzanalyse der Mittelwerte jedes Versuchstages und bei signifikantem Ergebnis die Bildung orthogonaler Kontraste. Die Abweichungsquadratsummen zwischen den Gruppen (SQ_{ze}) wurden in zwei Komponenten zerlegt. Der erste Kontrast (K_1) diente dem Vergleich der Gruppen mit kontinuierlicher und intermittierender Therapie, während im zweiten Kontrast (K_2) die Ergebnisse dieser beiden Gruppen denen nach alternierender Therapie gegenübergestellt wurden. Nach klinischen Erfahrungen war vor Versuchsbeginn diese Fragestellung formuliert worden (a priori !).In Tabelle 6 wird die Berechnung am Beispiel des 8. Versuchstages gezeigt. Die genauen Ergebnisse dieser Gruppe bringt Tabelle 7, in der die Signifikanzen durch Sternchen gekennzeichnet sind.

In den ersten 7 Tagen p.op. unterscheiden sich die drei Gruppen nicht nachweisbar, dann jedoch steigt der HRI bei Tieren mit alternierender Therapie sehr schnell, bei solchen mit intermittierender Therapie am langsamsten an. Signifikanzen erbrachte die Varianzanalyse am 8., 9. und 13. Tag (p 0,05).

Ein Unterschied zwischen den kontinuierlich und intermittierend behandelten Gruppen ließ sich durch die orthogonalen Kontraste nicht sichern; diese beiden Gruppen zusammen sind allerdings der mit alternierender Therapie signifikant überlegen. Ab dem 14. Versuchstag mußten wir den t-Test durchführen, da nur noch die Gruppen D_1 und D_3 bewertet werden konnten. Leider ließ sich auch mit dieser statistischen Methode kein signifikanter Unterschied feststellen.

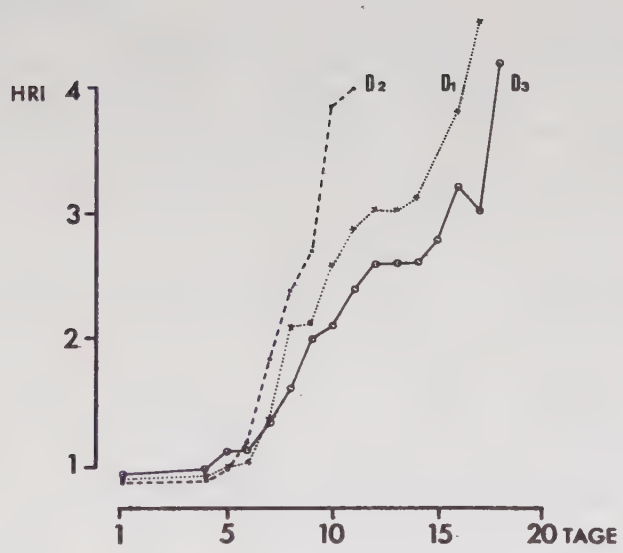

Abb. 8 Entwicklung des HRI bei kontinuirlicher (D1), alternierender (D2) und intermittierender GK-Therapie bei gleichzeitiger Behandlung mit 10 mg/kg Azathioprin/die.

Tabelle 5 Verlauf des HRI in den Gruppen D1-3
$\bar{x}$= Mittelwert, s= Standardabweichung

Tag	Gruppe D_1		Gruppe D_2		Gruppe D_3	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	0,84	0,05	0,86	0,05	0,86	0,05
2	0,79	0,07	0,81	0,06	0,77	0,07
3	0,79	0,07	0,75	0,05	0,75	0,05
4	0,88	0,04	0,86	0,05	0,88	0,07
5	0,93	0,08	0,98	0,05	1,05	0,36
6	0,99	0,16	1,19	0,45	1,12	0,34
7	1,31	0,67	1,88	0,83	1,37	0,49
8	1,55	0,80	2,40	0,64	1,54	0,63
9	1,79	0,82	2,69	0,48	1,83	0,67
10	2,41	1,79	3,85	1,37	2,19	0,58
11	2,75	2,10	4,04	1,21	2,51	0,33
12	3,05	1,90	4,04	1,21	2,49	0,30
13	3,05	1,90	4,43	0,57	2,46	0,52
14	3,12	1,91			2,60	0,64
15	3,58	2,01			2,80	0,82
16	3,81	1,52			3,24	0,92
17	4,54	2,91			3,01	0,98
18					4,12	3,11

Tabelle 6 Beispiel: Varianzanalyse am 8. Versuchstag

Varianzanalyse:

Var.Urs.	SQ	FG	MQ	$\hat{F}$
zwischen	4,1447	2	2,0724	$4,25^{x}$
innerhalb	11,705	24	0,4877	
total	15,8497	26		

$$F_{(2,24\ ;\ p=\ 0,05)} = 3,40$$

Orthogonale Kontraste:

	Gruppe D1	D2	D3	Kontrast	$\hat{F}$
K_1	+1		-1	0,0013	1
K_2	$-\frac{1}{2}$	+1	$-\frac{1}{2}$	4,14	8,50

$$F_{(1,24\ ;\ p=\ 0,01)} = 7,82$$

Tabelle 7 Statistische Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse der Gruppen D 1-3.

	Varianz-analyse	Orthogonale Kontraste		Student's t-Test
Tag	$\hat{F}_{(2,24)}$	$\hat{F}_{(1,24)}$	$\hat{F}_{(1,24)}$	$t_{(17)}$
1	1	-	-	
2	1	-	-	
3	1,51	-	-	
4	1	-	-	
5	1	-	-	
6	1	-	-	
7	1,82	-	-	
8	4,25	1	$8,50^{++}$	
9	$4,66^{+}$	1	$9,29^{++}$	
10	3,55	1	$6,76^{+}$	
11	2,73	-	-	
12	2,85	-	-	
13	$5,54^{+}$	1,09	$10,20^{++}$	
14				0,77
15				1,08
16				0,97
17				0,41

+ = p 0,05

++= p 0,01

5. Nachbehandlung mit ALG (Gruppe E)

Die zur Kontrolle mit Kaninchen-IgG behandelten Tiere zeigten bei der Transplantat-Abstoßung das gleiche Verhalten wie die unbehandelten Ratten (TST 11 Tage).

Demgegenüber konnte durch die Therapie mit KARLS die Rejektion des transplantierten Herzens bei zwei Tieren unbegrenzt (d.h. über 100 Tage p.op.) aufgehalten werden, obwohl Anzeichen für eine chronische Abstoßung im EKG sichtbar waren (Abb.9), die Herzen größer wurden und der HRI schließlich 3,4 bzw. 4,6 betrug. In Abb. 10 ist der Verlauf der verschiedenen Parameter über 200 Tage p.op. zu ersehen. Die beiden anderen Tiere dieser Gruppe starben wahrscheinlich an interkurrenten Infektionen am 4. bzw. 11.Tag p.op. . Die transplantierten Herzen zeigten bis zum Schluß eine gute Funktion (Frequenz 320 und 340 Schläge/min.). Auffallend waren die hohen Leukocytenwerte mit 23000 und 37000 bei deutlicher relativer Lymphocyten-Depression (7 bzw. 12 re.%), die auch bei den beiden lang überlebenden Tieren beobachtet werden konnten, während sie in dieser Form bei anderer immunsuppressiver Therapie niemals auftrat.

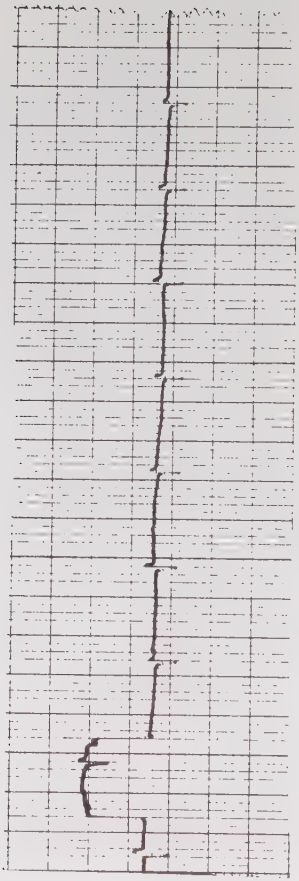

Abb. 9 Ableitung II einer mit KARLS behandelten Ratte (Gruppe E) am 14. Tag p.op. : Bradycardie und weitgehender R-Verlust. Der HRI betrug 1,6.

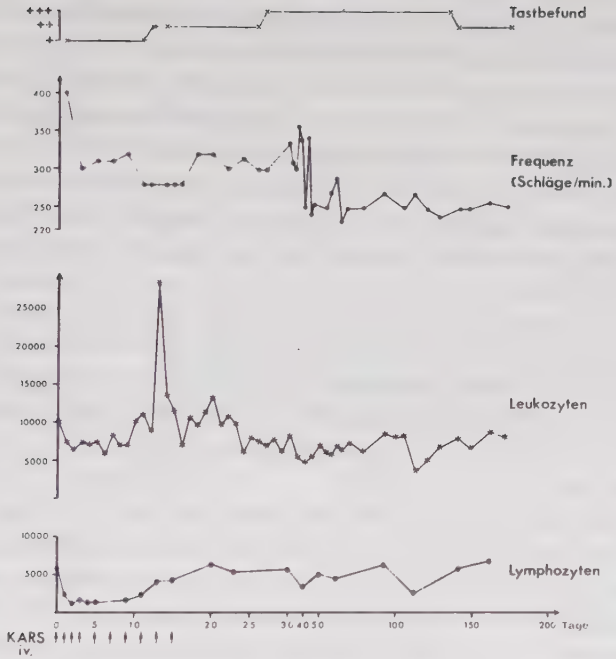

Abb. 10 Verlauf verschiedener Parameter bei einem lang überlebenden Tier der Gruppe E. Starke Lymphocytendepression in den ersten zwei Wochen, Erholung nach Absetzen der Serumgaben. Verspätet und verzögert ablaufende Abstoßungskrise vom 8.-12. Tag, dann wieder am 24. Tag, mehrere schwächere Rejektionen. Nach ungefähr 50 Tagen p.op. keine Verschlechterung bei Defektzustand.

IV. Diskussion

Um am Modell der heterotopen Rattenherztransplantation die verschiedenen Dosierungsformen (kontinuierlich, alternierend, intermittierend) von Glucocorticoiden zu untersuchen, haben wir nicht das in der Klinik gebräuchliche Fluocortolon (Ultralan, Schering), sondern das Methylprednisolon (Urbason, Hoechst) gewählt. Das Fluocortolon zeigt bei der Ratte eine wesentlich höhere Toxizität (Koch 1975), da im Gegensatz zum Menschen (Cortisol: Corticosteron = 7:1) die Nebennieren hier fast ausschließlich Corticosteron produzieren (Ganong 1971); es führt deshalb bei exogener Zufuhr zu einer stärkeren Nebennierenrindensuppression. Die dosisabhängige immunsuppressive Wirkung ist ebenso wie für das Prednisolon, das Hydrocortison und andere Glucocorticoide nachgewiesen (Fachet 1968).

Bei den Versuchen mit Ratten dürfen daher Dosierungen mit solchen beim Menschen keinesfalls verglichen werden; vergleichbar und auf den Menschen übertragbar sind aber die Ergebnisse die bei verschiedener Dosierungsform mit demselben Glucocorticoid an Ratten erzielt werden.
Eine weitere Rolle spielt bei der Anwendung der Corticoide- wie seit langem bekannt- der circadiane Rhythmus der Glucocorticoid-Sekretion: bei der Ratte liegt umgekehrt wie beim Menschen das Sekretionsmaximum am Abend. Daher ist die abendliche Applikation des Medikamentes empfehlenswert, wenn eine Suppression der Nebennierenrinde so weit wie möglich verhindert werden soll. Dieser Tatsache haben wir Rechnung getragen und zusätzlich die tageszeitlichen Schwankungen in der Transplantatüberlebenszeit (Ratte 1973) möglichst ausgeschaltet, indem die Operationen fast ausschließlich zwischen 10 und 14 Uhr durchgeführt wurden.

Die Dosierungen in unseren Versuchen mit Glucocorticoid-Monotherapie lagen bei kontinuierlicher Zufuhr mit 3 mg/kg Körpergewicht in dem von anderen Autoren gesteckten Rahmen (Shehadeh 1970 8 bzw. 12 mg/kg/die oder Semb 1971 2-5-10 mg/kg/die). Bei der einmaligen Stoßtherapie ist unsere Dosis

von 30 mg Methylprednisolon/kg Körpergewicht doppelt so hoch wie die von Bell 1973, der bereits mit 15 mg/kg eine geringe Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit erreichen konnte. Über die alternierende Gabe fanden wir im Zusammenhang mit der Verhinderung der Transplantatabstoßung keine Angaben, während ihre weniger schwere Auswirkung auf das Entstehen einer sekundären Nebennierenrindenatrophie bekannt ist (z.B. Kracht 1960). Eine intermittierende Stoßtherapie wird von Barnard 1969 in einem Bericht über die dritte Herztransplantation am Menschen diskutiert, er gab seinem Patienten - allerdings nach einer 42tägigen kontinuierlichen Therapie- die unzureichend erscheinende Dosis von 200 mg Prednisolon 8 bzw. 14 tägig. Experimentelle Ergebnisse mit dieser Applikationsform lagen bis auf einen Artikel von Coburg 1970 nicht vor.

Dabei ist eine rhythmische Beeinflussung der immunologischen Vorgänge naheliegend, nachdem man die Bedeutung des Timing bei Erzeugung von Toleranz und Enhancement und die Ergebnisse von Ratte 1973 kennt, der bei langüberlebenden Tieren nach Nierentransplantation Abstoßungskrisen in einem Vielfachen von 7,7 Tagen beobachtete.
Auf den Rhythmus der Corticosteron-Sekretion wurde bereits hingewiesen. Er begünstigt die intermittierende Anwendung von Glucocorticoiden, da nach sehr hoher Dosis mit entsprechender Lymphocytotoxizität die Nebenwirkungen bei günstig gewähltem Injektionszeitpunkt durch die kurze Halbwertszeit (Coburg 1970) sehr gering sind. Zu beantworten blieb die Frage, ob mit diesem Dosierungsschema eine ausreichende Immunsuppression erreicht werden kann.
Nach den Ergebnissen der Voruntersuchungen schien das der Fall zu sein, wenn man die statistische Auswertung mit dem Dunnett-Test und der Varianzanalyse betrachtet, doch konnten die Unterschiede in der Anwendungsform nach Abschwächung des Modells mit Azathioprin genauer aufgezeigt werden. Wahrscheinlich wäre das ebenfalls bei einer wesentlich niedrigeren Dosis eines Corticosteron-Derivates möglich gewesen.

Unsere Ergebnisse sollten eventuell an anderen Modellen überprüft werden:

1. Ein Modell mit subletaler Dosierung von Prednisolon oder besser Corticosteron würde die Unterschiede der Therapieformen noch deutlicher machen, vor allem würde neben der immunsuppressiven Wirksamkeit die Toxizität in die Versuchsergebnisse eingehen. Dabei würden wir für die kontinuierliche Therapie die höchste Toxizität bei mittlerer Transplantatüberlebenszeit erwarten, bei alternierender Therapie die höchste Tierbei kürzester Transplantatüberlebenszeit und für die intermittierende Behandlung die längste Transplantatüberlebenszeit (also stärkste Immunsuppression) bei mittlerer Überlebenszeit der Tiere (entsprechend der Toxizität).

2. Die orthotope Herztransplantation an der Ratte, möglichst ohne Herz-Lungen-Maschine (bei Messmer 1969), besser mit Hilfe temporärer cross-circulation mit einem syngenen Tier in Unterkühlung. Dieses Modell böte neben der Möglichkeit von EKG-Kontrollen die der Überprüfung der Größenzunahme anhand der Röntgenaufnahme des Thorax, vor allem aber würde die FST (functional survival time) der postoperativen Überlebenszeit des Tieres entsprechen. Man hätte also eindeutigere und besser objektivierbare Kriterien der Transplantatfunktion.

Im heterotopen Modell haben wir einen HRI von 4 als Grenzwert angesehen, da elektrische Aktivitäten bei den therapierten Tieren noch lange nach dem Endpunkt der Größenveränderung registrierbar waren.
In unseren Versuchen konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen kontinuierlicher und intermittierender Therapie zwar nicht statistisch verifizieren, das andeutungsweise bessere Ergebnis der intermittierenden Gabe trotz der weiten zeitlichen Verschiebung der Abstoßungsreaktion und die dadurch bedingte Beeinflussung des HRI schlägt sich aber auch in der graphischen Darstellung (s. Abb. 8) nieder, in der sich die Kurven dieser beiden Gruppen nicht kreuzen. Abgesehen davon konnte dieses Dosierungsschema in der Monotherapie das einzige signifikante Ergebnis erreichen. Die Signifikanz im Vergleich

mit der alternierend behandelten Gruppe konnte gesichert werden, obwohl das nach den Berichten von Reed 1970 über Nierentransplantate nicht zu erwarten gewesen war.
Bei allen Versuchsergebnissen muß berücksichtigt werden, daß wir zwar unter reproduzierbaren Bedingungen gearbeitet haben im Bezug auf Histokompatibilität, Geschlecht, Alter und Gewicht der Tiere, ihre Haltung, den Operationszeitpunkt, die Dosierung und Applikation der Medikamente. Es können jedoch Unterschiede in der Transplantatüberlebenszeit auftreten, wenn zufällig besonders empfindliche Gebiete des transplantierten Organs von den morphologischen Veränderungen durch die Abstoßungsreaktion betroffen werden und es so zu einer entscheidenden Funktionsstörung kommt. Außerdem sind morphologische und daraus resultierende funktionelle Schäden des Herzens zu einem gewissen Anteil auf andere Ursachen wie z.B. intra- und postoperative Ischämie zurückzuführen. Wir haben deshalb keine Nadelbiopsien entnommen (wie Leedham 1971), zumal die Diagnose der Abstoßung beim Herztransplantat im Gegensatz zum Nierentransplantat ohne Histologie gestellt werden kann. Eine weitere Untersuchung könnte sich allerdings mit der planimetrischen Auswertung von Serienschnitten befassen, um vielleicht auch so Unterschiede zwischen den Therapieformen aufzudecken.

Die Ergebnisse der mit KARLS behandelten Transplantatempfänger sind mit denen der vorher beschriebenen Gruppen wegen der großen Streuung der Überlebenszeiten schwer zu vergleichen. Zwei Tiere dieser Gruppe starben wahrscheinlich an interkurrenten Infektionen bei guter Transplantatfunktion. Praefinal beobachteten wir einen Leukozytenanstieg, im Blutbild fanden wir toxische Granulationen. Die auch zu diesem Zeitpunkt niedrigen Lymphozytenzahlen haben wir auch bei den beiden lang überlebenden Tieren, in anderen Gruppen jedoch nie registriert. Damit hatte die Gruppe E -wenn man bei der kleinen Anzahl der Tiere überhaupt Rückschlüsse ziehen darf- wohl den höchsten Ausfall durch Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie. Dem widersprechend berichtet Fateh-Moghadam bereits

1967 über Versuche mit ALS, bei denen die Versuchstiere keine Resistenzschwäche gegen bakterielle Infektionen bzw. Zeichen eines Antikörpermangelsyndroms zeigten.

Neuere Untersuchungen befassen sich mit der Annahme von Organtransplantaten bei vorbehandelten Tieren, außerdem muß das experimentell hervorragend bewährte aktive Enhancament in seiner Brauchbarkeit für die Klinik weiter erprobt werden.

Schlußfolgerungen

Aufgrund unserer experimentellen Ergebnisse, die nach klinischer Fragestellung entstanden und die wir für übertragbar auf die Klinik halten, glauben wir schließen zu dürfen:

1. Die alternierende Glucocorticoid-Gabe ist der kontinuierlichen im Bezug auf die Immunsuppression unterlegen und sollte nach Organtransplantation nicht angewandt werden.
2. Die intermittierende Glucocorticoid-Therapie (1 Dosis jeden 3.Tag) ist der niedriger dosierten kontinuierlichen Therapie bei geringeren Nebenwirkungen in ihrer immunsuppressiven Wirkung mindestens ebenbürtig und auch für die Langzeittherapie geeignet.
3. Die Dosis muß mit größer werdendem zeitlichem Abstand zwischen den Einzelgaben um ein Vielfaches erhöht werden. So reicht die Verdopplung nicht aus, um das Intervall um 24 Stunden zu verlängern, mit 10 facher Dosis kann man es allerdings um 48 Stunden ausdehnen.
4. Der immunsuppressive Wirkungsmechanismus bei kontinuierlicher und intermittierender Therapie ist wahrscheinlich ein anderer.

V. Zusammenfassung

Nach syngenen und allogenen unbehandelten Kontrollen von heterotopen Herztransplantationen an Ratten ($LBNF_1$ - L) in der Technik von Lee, modifiziert nach Siedek, untersuchten wir in der Hauptsache die kontinuierliche, alternierende und intermittierende Glucocorticoid-Applikation auf ihre immunsuppressive Wirksamkeit.
Die GK-Monotherapie ergab nur für die intermittierende Stoßtherapie eine signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit.
In einer Versuchsreihe stellten wir die "kritische" Azathioprindosis von 10 mg/kg/die zur Abschwächung des Modells fest.
Bei einer Basistherapie mit dieser Medikation wurden in drei Gruppen die Behandlungsschemata verglichen:

kontinuierlich : 3 mg/kg/die Methylprednisolon
alternierend : 6 " "
intermittierend: 30 " "

Bewertungsgrundlage war der Funktionsindex HRI.

Das Ergebnis der alternierenden Therapie war signifikant schlechter als das der kontinuierlichen und intermittierenden und sollte deshalb nicht angewandt werden.
Die intermittierende Gabe bot geringe Nebenwirkungen bei wirksamer Beeinflussung der Transplantationsimmunität sowohl bei Monotherapie als auch in Kombination mit Azathioprin.

Literatur

1. Addison
On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules.
London. Samuel Highley 1855
zitiert nach:
Schwartz, R.S.
Immunosuppressive Drug Therapy in Human Transplantation.
Herausg.: F.T. Rapaport und J. Dausset, Grune und Stratton, New York und London 1968

2. Alexandre, G.P.J., Morelle, J., van Ypserle, Ch., Sokal,G., Coche,E.
Die Abstoßungskrise.- Ihre Bedeutung zum Verständnis der Histokompatibilität sowie in der Abwägung der Zweckmäßigkeit einer immunsuppressiven Behandlung.
Langenbeck`s Archiv f.klin. Chirurgie 325 (1969) 692

3. Alexandre, G.P.J.
Diskussionsbeitrag
ALG-Tagung der Fa. Behring Marburg 1971

4. Andre, J.A., Schwartz, R.S., Mitos, W.J., Dameshek, W.
The morphologic responses of the lymphoid system to homografts.
II. The effects of antimetabolites.
Blood 19 (1962) 334

5. Barnard, C.N.
A New Approach to the Treatment of Rejection: Experience with the Third Human-to-Human Heart Transplantation Performend in Cape Town.
Progress in Cardiovascular Diseases 12: 201 (1969)

6. Barnes, B.A., Schad, P.B., Pinn, V.W.
Modification of the graft versus host reaction in F_1-mice treated with 6-mercaptopurine.
Transpl. 4 (1966) 154

7. Bayliss, R.J.S.
Surgical collapse during and after corticosteroid therapy.
Brit.Med.J. 2 (1958) 935

8. Bell, P.R.F., Briggs,J.D., Calman,K.C., Quin,R.O., Wood,R.F.M. Paton,A., MacPherson, S.G.
The immunosuppressive effect of large doses of intravenous prednisolone in experimental heterotopic rat heart and human renal transplantation.
Surgery 73 (1973) 147-152

9. Berenbaum, M.C.
Immunosuppressive Agents in Organ Transplantation
by Felix Largiadèr, Thieme Verlag Stuttgart 1970

10. Berglund, K., Fagraeus, A.
Effect of cortison on antibody formation.
Proc.VI. Internat. Cong. Microbiol. 2 (1953) 231

11. Berglund,K.
Studies on factors which condition the effect of cortisone on antibody production. 2. The significance of the dose of antigen in primary hemolysin response.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 38 (1956) 329

12. Bethge, H.
Die steroidinduzierte Nebennierenunterfunktion
Klin.Wschr. 48 (1970) 317

13. Borel, Y., Schwartz, R.S.,
Inhibition of immediate and delayed hypersensitivity in the rabbit by 6-mercaptopurine.
J. Immunol. 92 (1964) 754

14. Brendel, W.
Grundlagen des Antilymphozytenglobulins und seine therapeutischen Möglichkeiten.
Arzneimittelforschung 20 (1970) 191

15. Brendel, W.
Transplantation und Immunologie
Archiv Ohrenheilkunde 196 (1970) 39

16. Brendel, W.
Antilymphozytenglobulin heute.
Münch.Med. Wschr. 115 (1973) 241

17. Brink-Johnson, T., Dougherty, T.F.
Studies on the effect of cortisol and corticotropin on incorporation of adenine 8- ^{14}c into the lymphatic tissue nucleic acids.
Acta Endocrin. 49 (1965) 471

18. Bücherl,E.S., Eisele,R., Köhn,K., Nasseri,M. Zuschneid,W.
Über die Beeinflussung der Toleranz bei Lungentransplantationen durch Behandlung mit Imuran.
Langenbeck`s Archiv klin. Chir. 315 (1966) 126

19. Brunner,P., Pesch,H.-J., Mathkies,F., Grabner,W.
Organverfettung nach Kortikoid-Applikation.
Fortschritte d.Med. 92 (1974) 389

20. Calne, R.Y.
Renal Transplantation
London Arnold 1963

21. Caskey, C.T., Ashton,D.M., Wyngaarden, J.B.
The enzymology of feedback inhibition of glutamine phosphoribosylpyrophosphate aminotransferase by purine ribonucleotides.
J.Biol. Chem. 239 (1964) 2570

22. Coburg,A.J., Samuel,H.G., Kalz,F.H., Penn,J., Halgrimson,Ch.
Disapperent rates and immunosuppression of intermittent intravenously administered prednisolone in rabbits and human beeings.
Surg.Gyn.a. Obst. 131:933 (1970)

23. Dahmus,M.E., Bonner,J.
Increased template activity of liver chromatin, a result of hydrocortisone administration.
Proc. Nat. Acad. Sci. 54 (1965) 1370

24. Dargent,M., Bourgoin,J.J., Noel,P., Weissbrod,R.
The influence of Azathioprine on Tumorgenesis by 7-12 Dimethylbenz (a) Anthracene in Rats.
Europ.J. Cancer 8 (1972) 605

25. Diamantstein,T.
Zum Wirkungsmechanismus der Corticoide bei der Immunsuppression.
Archiv Ohrenheilkunde 196 (1970), 76

26. Dougherty,T.F.
Some observations on mechanisms of corticosteroid action on inflammation and immunologic processes.
Ann.NY. Acad. Sci. 56 (1953) 748

27. Dougherty, T.F., Brown,H.E., Berliner,D.L.,
Metabolism of hydrocortisone during inflammation.
Endocrinology 62 (1958) 455

28. Dukor, P., Dietrich,F.M.,
Characteristic features of immunosuppression by steroids and cytotoxic drugs.
Int.Arch. Allergy 34 (1968) 32

29. Dukor,P., Dietrich,F.M.
Organtransplantation, Immunologie und Klinik.
Sympos.Dt. Gesellsch.f. Allergie u. Immunitätsforschung Bonn, 26.-28.5 1968)
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1969

30. Dumonde,D.C., Wolstencroft,R.A., Panayi,G.S., Matthew,M., Mosley,J., Howson,W.T.
"Lymphokines": Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.
Nature Lond. 224 (1969) 38

31. Einhorn,M., Davidsohn,I.
Hepatotoxicity of mercaptopurine.
JAMA 188 (1964) 802

32. Fachet,J., Stark,E., Palkovib, M.
Effect of a single neonatal glucocorticoid injection on the thymos-lymphatic and enocrine system and on the growth of the rat and the dog.
Acta Med.Acad. Sci. Hung. 25 (1968) 395

33. Fagraeus,A.
Cellular reaction in antibody formation.
Acta haemat. 20 (1958) 1

34. Fateh-Moghadam,A., Pichlmayr,R., Morell,Ch., Knedel,M.
Verhalten der Immunglobuline und der Antikörperbildung während der Behandlung mit hererologem Antilymphozytenserum.
Klin.Wschr. 45 (1967) 665

35. Fraser,Ch.G., Preuss,F.S., Bigford,W.D.,
Adrenal atrophy and irreversible shock associated with cortisone therapy.
JAMA 149/II (1952) 1542

36. Floersheim,G.L.
Medikamente für die Organtransplantation
Langenbeck`s Arch.Klin.Chir. 322 (1968) 470

37. Ganner,E., Osment,J., Dittrich,P., Huber,P.
Chromosomes in patients treated with azathioprine.
Humangenetik 18 (1973) 231

38. Ganong, W.F.
Medizinische Physiologie
Springer Verlag Berlin 1971

39. Gewurz,H., Wernick, P.R., Quie, P.G., Good,R.A.
Effects of hydrocortisone succinate on the complement system.
Nature 208 (1965) 755

40. Girardet,R., Friedman,E.A., Karlson,U.E.
Rabbit-anti-rat lymphocyte serum-induced lymphopenia in thoracic duct lymph and peripheral blood.
Surgery 76 (1974) 267

41. Gray,J.G., Monaco,A.P., Russell,P.S.
Surg.Forum 15 (1964) 142

42. Guttman,R.D.
Genetics of acute rejection of rat cardiac allografts and a model of hyperacute rejection.
Transplantation 17 (1974) 383

43. Hedding,C.
Palpatorische, elektrokardiographische, biochemische und histologische Befunde nach allogener heterotoper Herztransplantation an der Ratte
Dissertation Bonn 1976

44. Hume,D.M., Lee,H.M., Williams,G.M., White,H.J.O., Ferre,J., Wolf,J.S. Pront,G.R., Slapak,M.J., O´Brien,J., Kilpatrick,S. J., Kauffman,H.M., Cleveland,R.J.
Comparative results of cadaver and related donor renal homografts in man, and immunologic implications of the outcome of second and paired transplants.
Ann. Surg. 164 (1966) 352

45. Ingle, D.J.
Atrophy of the thymus in normal and hypophysectomized rats following the administration of cortin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38 (1938) 443

46. Kaden,J.
Immuntoleranz und Antilymphozytenseren
Zeitschrift ärztl. Fortbild. 65 (1971) 522

47. Kass,E.H., Kendrick, M.
Effects of cortisone on nucleoproteins of lymph nodes.
Fed. Proc. 11 (1952) 472

48. Kass, E.H., Kendrick,M.I., Finland,M.
Effect of certain corticosteroids and of growth hormone on nucleoproteins in lymph nodes.
Ann.NY. Acad. Sci. 56 (1953) 737

49. Keitel, W.
Immunsuppressive Therapie
Zeitschr. f. ärztl. Fortbild. 65 (1971) 847

50. Kidson,C.
Cortisol in the regulation of R.N.A. and protein synthesis.
Nature 213 (1967) 779

51. Klein,G.
Immunological factors affecting tumor growth.
Brit.Med.J. IV (1970) 418

52. Koch, H.R.
persönliche Mitteilungen

53. Kracht,J.
Auswirkungen intermittierender Corticoidgaben auf die sekundäre Nebennierenrindenatrophie.
Endokrinologie 39 (1960) 80

54. Krokowski, E.
Kortikoid-Osteoporose.
Med. Klinik 67 (1972) 1149

55. Lance, E.M.
Mode of action of antilymphocyte serum.
Fed. Proc. 29 (1970) 209

56. Land,W., Frick, E., Brendel, W.
Experimentelle allergische Enzephalomyelitis: Ein Modell zur Prüfung der Wirksamkeit des heterologen Antilymphozytenserums auf die zelluläre Immunreaktion.
Langenbeck`s Arch. klin. Chir. 322 (1968) 525

57. Land,W.,Rudolph, R., Brendel,W.
Ultrastrukturelle Zell- und Organveränderungen nach Verabreichung eines heterologen Antilymphozytenserums bei der Ratte.
I. Mitteilung Strukturwandel von Zellen aus dem Ductus thoracicus.
Blut XIX. (1969) 470

58. Lee,S., Lie,T.S.
Arbeitstagung: Organtransplantation an der Ratte
Chir. Universitätsklinik Bonn 1973

59. Leedham,P.W., Baum,M., Cullum,P.A.
Acute and modified rejection of heterotopic canine cardiac allotransplants studied by serial needle biopsy.
Thorax 26 (1971) 534

60. Levey,R.H., Medawar,P.B.
Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum.
Proc. Nat. Acad. Sci. 56 (1966) 1130

61. Levey, R.H., Medawar,P.B.
Further experiments on the action of antilymphocytic antiserum.
Proc. Nat. Acad. Sci. 58 (1967) 470

62. Lundin, M., Schelin,U.
The effect of steroids on the histological ultrastructure of lymphoid tissue. I. Acute thymic involution.
Path. Europ. 1 (1966) 15

63. Mc Collister, R.J., Gilbert, W.R., Wyngaarden, J.B.
Pseudofeedback inhibition of purine syntheses by 6-mercaptopurine and other purine analogues.
J. Clin. Invest. 41 (1962) 1383

64. Malkiel, S., Hargis, B.J.
The effect of ACTH and cortisone on the quantitative precipitin reaction.
J. Immun. 69 (1952) 317

65. Mannick,J.A., Lee,H.M., Egdahl,R.H.
The effect of 6-mercaptopurine on immune responsiveness of the dog.
Surg.Gynec.Obstet. 114 (1962) 449

66. Mannick, J.A., Egdahl,R.H.
Endocrinologic agents
Human transplantation
Herausg.: F.T Rapaport und J. Dausset
Grune und Stratton,NY und London 1968

67. Monaco,A.P., Abbot,W.M., Ottersen,H.B., Simons,R.L., Wood, M.L., Flax, M.H., Russell, P.S.
Antiserum to lymphocytes :
Prolonged survival of canine renal homografts.
Science 153 (1966) 1264

68. Najarian,J.S., Simmons,R.L.
The clinical use of antilymphocyte globulin.
The New England Journal of Medicine 285, 1 (1971) 158

69. Newsome,S.E., Darrach, M.
The effect of cortisone acetate in the production of circulating hemolytic antibodies in the mouse.
Canad.J. Biochem. Physiol. 32 (1954) 372

70. Overman,J.R., Haman,R.
Effect of cortisone on mumps antibody formation in rabbits.
Proc.Soc. Exp. Biol. 82 (1953) 427

71. Palm,J.
Immunogenetic analysis of Ag-B histocompatibility antigens in rats.
Transplantation 11, (1971), 175

72. Paraskevas,F., Anderson,E.D., Israels,L.G.
The reaction of antilymphocyte serum with lymphocytes.
I.The blocking of surface-associated -globulin.
Transplantation 13 (1972) 212

73. Pelletier,G.
Les immunosuppresseurs.
Laval. Med. 41 (1970) 1156

74. Pendergast,R.A.J.
Cellular specifity in the homograft reaction.
J. Exp.Med. 119 (1964) 377

75. Perper,R.J., Lyster,S.C., Monovich,R.E., Bowersox,B.E.
Analysis of the biological activity of antilymphocyte serum.
Transplantation 9 (1970) 447

76. Pichlmayr,R.
Aussichten und Probleme der immunsuppressiven Behandlung mit Antilymphozytenseren. aus:
Organtransplantation - Immunologie und Klinik
Sympos.Dt. Gesell. f. Allergie und Immunitätsforschung
Bonn 26.-28.5.1968 Herausg.: A. Heymer,D.Ricken
F.K.Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1969 S.189

77. Pichlmayr.R.
Die Bedeutung von Antilymphozytenseren für die Immunsuppression.
Langenbeck`s Archiv f. klin. Chir. 322 (1968) 485

78. Pichlmayr.R.
Prinzipien der immunsuppressiven Therapie.
Langenbeck`s Arch. klin. Chir. 329 (1971) 723

79. Ratte, J., Halberg,F., Kühl, J.F.W., Najarian,J.S.
Circadian variation in the rejection of rat kidney allograft.
Surgery 73 (1973) 102

80. Raju,S., Grogan,J.B.
Heterologous antilymphocyte serum.
Transplantation 8 (1969) 695

81. Reed,W.P., Lucas,Z.J., Cohn,R.
Alternate-day prednisone therapy after renal transplantation.
Lancet 1 (1970) 747

82. Reis,H.E., Krause,P.H., Passek,S., Gille,J.
Untersuchungen zur Frage der nephrotoxischen Wirkung von Antilymphozytenserum.
Klin.Wschr. 49,1 (1971) 613

83. Robinson,R.
Genetics of the Norway-rat.
Pergamon,New York 1965

84. Schmähl,D., Osswald,H.
Experimentelle Untersuchungen über carcinogene Wirkungen von Krebs-Chemotherapeutika und Immunosuppressiva.
Arzneimittelforschung 20.2 (1970) 1461

85. Schreck,R.
Color test to measure the toxicity of adrenal cortex hormones to lymphocytes.
Proc. Soc. Exp. Med. 76 (1951) 557

86. Schwartz,R.S., Dameshek,W.
Drug induced immunological tolerance.
Nature 183 (1959) 1682

87. Schwartz,R.S., Dameshek,W.
The effects of 6-mercapto-purine on homograft reactions.
J. Clin. Invest. 39 (1960) 952

88. Semb,B.K.H., Abrahamsen,A.M.
Electrocardiographic changes of heterotopic heart allografts in dogs receiving immunosuppressive treatment.
Scand.J. Thor. Cardiovasc. Surg. 5 (1971) 246

89. Seifert,J., Brendel,W.
The effect of antilymphocyte serum on homologous ^{51}Cr-labeled lymphocytes in rats.
Transplantation 8 (1969) 806

90. Shehadeh,I.H., Guttmann,R.D., Lindquist,R.R.
Renal transplantation in the inbred rat. XV. An assay of three immunosuppressive drugs.
Transplantation 10 (1970) 66

91. Siedek,M.
Die Beeinflussung der Transplantationsimmunität durch Glucocorticoide in Abhängigkeit vom Dosierungsschema.
Habilitationsschrift Bonn 1974

92. Simmons,R.L., Moberg,A.W., Gewurz,H., Soll,R.Tallent,M.B., Najarian,J.S.
Immunosuppressive assay of antilymphoblast globulin in man: Effect of dose, histocompatibility, and serologic response to horse gammaglobulin.
Surgery 68 (1970) 62

93. Snell,G.D.
The terminology of tissue transplantation.
Transplantation 2 (1964) 655

94. Stavy,L., Cohen,I.R., Feldman,M.
Stimulation of rat lymphocyte proliferation by hydrocortisone during the induction of cell mediated immunity in vitro.
Transplantation 17 (1974) 173

95. Starzl.T.E., Marchioro,T.L., Porter,K.A., Wasaki,Y., Cerilli,C.J.
The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human renal homotransplantation.
Surg. Gynec. Obstet. 124 (1967) 301

96. Stevens,W., Colessides,C., Dougherty,T.F.
Effects of cortisol on the incorporation of thymidine 2-^{14}C into nucleic acids of lymphatic tissue from adrenalectomized CBA mice.
Endocrinology 76 (1965) 1100

97. Thierfelder,S., Eulitz,M., Kimura, J.
Cross reacting antibodies in heterologous lymphocytic antiserum of rabbits.
III. Kongr. Europ.Ges. f. exp. Chir. München 1968

98. Torrigiani,G., Roitt,I.M.
The enhancement of 19 antibody production by particulate antigen.
J. Exp. Med. 122 (1965) 181

99. Traeger,J., Tries,D., Perrin,J.
The results of the use of antilymphocytic globulins in human kidney transplantation.
Eur. Surg. Res. 1 (1969) 81

100. Weissmann,G., Thomas,L.
Studies on lysosomes.II. The effect of cortisone on the release of acid hydrolasese from a large granule fraction of rabbit liver induced by an excess of vitamin.
J. Clin. Invest. 42 (1963) 661

101. Wiener,J., Cottrell,T.S., Margareten,W., Spiro,D.
An electron microscopic study of steroid induced reticuloendothelial blockade.
Amer.J. Path. 50 (1967) 187

102. Woodruff, M.F.A.
The transplantation of tissue and organs.
Thomas, Springfield, Illionois 1960

103. Woodruff, M.F.A., Anderson, N.F.
The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of antilymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats.
Ann. NY. Acad. Sci. 120 (1964) 119

104. Zukoski, C.F., Lee, H.M., Hume, D.M.
The effect of 6-mercaptopurine on renal allograft survival in the dog.
Surg. Gynec. Obstet. 112 (1961) 707

Herrn Priv. Doz. Dr. med. M. Siedek danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die engagierte Anleitung bei der Durchführung der Arbeit.
Herr Prof. Totovic, Path. Institut, gestattete mir freundlicherweise den idealen Laborplatz in seinem Tierhaus zu benutzen, sowie die hervorragende Unterbringung der Tiere, deren Pflege und Zucht Herr Terluin vorzüglich überwachte.

VII. Lebenslauf

Am 27.4.1951 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Erich Hedding und seiner Ehefrau Johanna, geb. Bongartz in Büttgen bei Neuss geboren. Von Ostern 1957 bis Ostern 1961 besuchte ich die Kath. Volksschule in Büttgen und wechselte dann auf das Staatl. Quirinus-Gymnasium in Neuss, wo ich am 21.6.1969 an der altsprachlichen Abteilung das Abitur bestand.
Mein gesamtes Medizinstudium, das ich am 25.6.1975 erfolgreich mit dem Staatsexamen abschloß, absolvierte ich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
Am 26.6.1975 heiratete ich die Medizinalassistentin Cordula Henke.
Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent bei den Städt. Krankenanstalten Kemperhof in Koblenz angestellt.